

---

マイクロフロントル法による血清中低分子キャリアー  
蛋白質群の高精密機能測定

---

18590528

平成18年度～平成19年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成20年6月

研究代表者 石田哲夫  
滋賀医科大学医学部准教授

血清中には、特定の低分子有機化合物（生理的代謝産物や薬物など）を結合することを主機能とするタンパク質の一群（リガンドキャリアータンパク質）が存在する。例えば、全血清タンパク質の約 60%を占める血清アルブミンは脂肪酸の運搬に重要な役割を果たすが、それだけでなく、多くの薬物の体内動態にも大きな影響を与える。しかし、現行の臨床血液検査では、これらのキャリアータンパク質の機能を測定することは実施されていない。

本研究では、ルーチンの臨床検査で採取されている量の血液を用いて、血清キャリアータンパク質の結合機能を精密に測定する方法を開発することを目指した。これらのタンパク質のリガンド結合機能の生理的変動（日内変動や加齢）や病理的変動（糖尿病などの慢性疾患や感染症などによる）を測定できるようになれば、未知の多くの情報を収集できるようになり、病気の予防や診断・治療に役立つことが期待される。

本研究期間内に実現する具体的な目標として、以下の二つを設定した。

1. 微量の試料を用いて精密なりガンド結合曲線を測定する方法を確立すること。

2. 小動物（ラット、マウス）の一匹から得た血清で本方法を実証すること。

本課題研究により、タンパク質の結合機能を精密に測定する方法として、ミクロフロンタルゲルろ過法（mFGC 法）を確立することができた。

## 研究組織

研究代表者 石田 哲夫（滋賀医科大学医学部准教授）

研究分担者 田中 裕之（滋賀医科大学医学部助教）

## 交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	2,200,000	0	2,200,000
平成 19 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	390,000	3,890,000

## 研究発表

### （1）雑誌論文

1. Tanaka, H., Yamamoto, A., Ishida, T., Horiike, K.

D-Serine dehydratase from chicken kidney: a vertebral homologue of the cryptic enzyme from *Burkholderia cepacia*. J. Biochem. 査読有 143 (2008), 49-57

2. Senda, M., Kishigami, S., Kimura, S., Fukuda, M., Ishida, T., Senda, T.

Molecular mechanism of the redox-dependent interaction between



NADH-dependent ferredoxin reductase and Rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin.  
J. Mol. Biol. 査読有 373 (2007), 382–400

3. Yamamoto, A., Tanaka, H., Ishida, T., Horiike, K.,  
Functional and structural characterization of D-aspartate oxidase from porcine  
kidney: Non-Michaelis kinetics due to substrate activation. J. Biochem. 査読有  
141 (2007), 363–376
4. Tanaka, H., Yamamoto, A., Ishida, T., Horiike, K.,  
Simultaneous measurement of D-serine dehydratase and D-amino acid oxidase  
activities by the detection of 2-oxo-acid formation with reverse-phase  
high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 査読有 362 (2007),  
83–88

(2) 学会発表

1. 石田哲夫、田中裕之、山本篤、堀池喜八郎  
タンパク質 - リガンド相互作用の定量的解析  
日本生化学会、2007年12月13日、パシフィコ横浜
2. 山本篤、田中裕之、石田哲夫、堀池喜八郎  
ブタ D-アスパラギン酸オキシダーゼの反応機構  
日本生化学会、2007年12月11日、パシフィコ横浜
3. 田中裕之、山本篤、石田哲夫、堀池喜八郎  
ニワトリ腎臓由来の D-セリンデヒドラターゼの精製と性状解析  
日本生化学会、2007年12月11日、パシフィコ横浜
4. 堀池喜八郎、石田哲夫、山本篤、田中裕之  
非ヘム 2 価鉄イオン依存性酸素添加酵素の反応機構  
日本農芸化学会、2007年9月10日、京都大学
5. 石田哲夫  
マイクロフロンタルゲルろ過によるタンパク質-リガンド相互作用の解析  
第6回国際バイオフィォーラム、2007年6月21日、東京ビッグサイト
6. 石田哲夫、田中裕之、山本篤、堀池喜八郎  
Molecular mechanism of substrate specificity of catechol 2,3-dioxygenase  
日本生化学会、2006年6月19日、京都国際会議場

## 研究成果

### (1) タンパク質 - リガンド相互作用の定量的解析

タンパク質には、働きかける相手となる特定のイオンや分子がある。タンパク質が相互作用する相手となる物質は、便宜上、リガンドと総称される。すべてのタンパク質の機能発現の第一ステップは、リガンドを結合することである (図1)。例えば、ヘモグロビンの主要な生理的リガンドは、酸素分子である。化学反応を触媒する酵素の場合は、反応物リガンドは特に基質と呼ばれる。

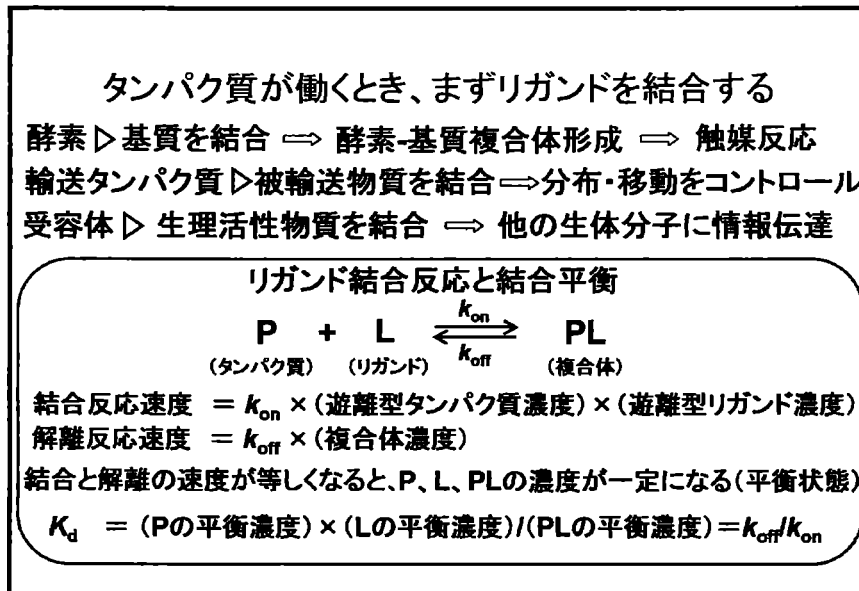


図1

このような事情から、何をしているのか分からないタンパク質の機能を探索する早道としてその生理的リガンドを見つける試みがなされている。このような試みが成功するためには、タンパク質 - リガンド相互作用を効率よくハイスループットに測定する方法が開発されてきた。現行のこれらの方法は、実質的には相互作用の強弱判定法で、定量的なデータを得ることは困難である。しかし、結合データベースに要求されるのは定量的なデータであり、高い定量性とハイスループット性とを併せ持つ測定法が求められている。

### (2) タンパク質 - リガンド相互作用の定量的データから分かること

タンパク質にリガンド (リガンドがタンパク質、核酸、糖鎖など生体高分子であることも多い) が何個まで結合するのか (結合反応の化学量論)、どのくらいの強さで結合するのか (結合定数やその逆数である解離定数) ? これらの基本情報は、定量的に相互作用を解析してはじめて明らかになる。例えば、ヘモグロビンは酸素分子を体の隅々まで行き渡らせる。ヘモグロビンが、酸素が多いところでは (肺) 強く、酸素が少ないところでは弱く、酸素分子を結合するからである。この有名なS字型の酸素結合特性は、定量的相互解析で明らかにされた。

### (3) 結合曲線の全貌を測定する必要性

結合曲線とは、タンパク質1分子あたりに結合しているリガンドの平均数と遊離型リガンドの濃度との関係で、縦軸に前者、横軸にリガンドの濃度をとってグラフで表現する。図2に、3つの結合モデル系の理論結合曲線を示す(5%の測定誤差を含めて計算)。

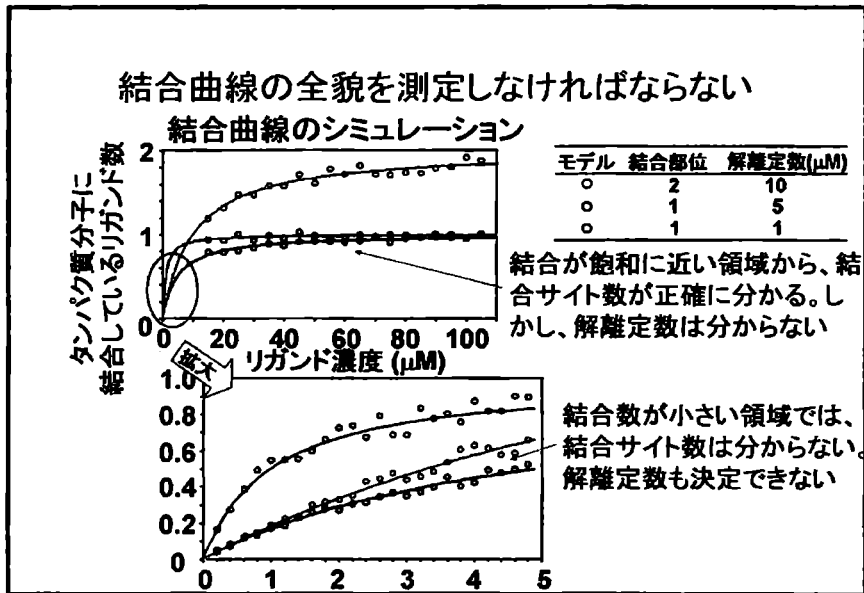


図2

結合が飽和に近づく高リガンド濃度領域のデータから(図2、上の図)、各モデルの結合部位の数が正確に分かる。一方で、高濃度領域のデータのみからでは結合の強さ(解離定数)を決定することができず、結合部位数1の2つのモデルの区別ができない(両者は結合の強さが異なり、解離定数が小さいほど結合が強い)。

図2の下図は、リガンド濃度が小さく、タンパク質の平均結合リガンド数が0-0.4の領域の拡大図である。この低濃度領域のデータからは、解離定数が1 μMの最も結合が強いモデルと、その他の2つのモデル(解離定数がそれぞれ5 μMと10 μM)とを区別できるが、結合サイト数が異なる後者の二つのモデルは、見分けられない。

図2の簡単なシミュレーションから導かれる重要な結論は、タンパク質に何個のリガンドがどのくらいの強さで結合するかを知るには、結合曲線の全貌が必要であるということである。

#### (4) 結合曲線の測定方法

図3に結合曲線を測定する手順を示す。まず、タンパク質とリガンドの混合液を調製する。その際、この混合液のタンパク質とリガンドのそれぞれの総濃度が正確に定まるように調製する。次に、この混合液の結合型リガンドの平衡濃度か、または、遊離型リガンドの平衡濃度か、のどちらかを測定する。このどちらかひとつが分かれば、タンパク質1分子当たりの平均結合リガンド数とそのときの遊離型リガンド濃度とを知ることができる。

結合型リガンド濃度を測定するためには、結合型リガンド量に直接関連した(通常は比例した)量を測定する。結合型リガンド量に関連する(ただし単純な比例関係になるのは結合サイトが1個だけの場合)量として、主に以下のものが利用され

ている。①タンパク質かリガンドのどちらかに色がある場合は、リガンドの結合に伴う色の変化（吸光度、蛍光、円偏光二色性などで測定）、②結合熱が発生する場合は、その発熱量、③結合に伴うタンパク質の質量増加（通常はタンパク質をセンサーに固定し、リガンドの結合によるセンサーの物性変化を測定）、④リガンドの結合に伴うタンパク質（またはリガンド）の NMR（核磁気共鳴）シグナルの変化。これらの変化量から結合型リガンド量を算出するためには、両者の正確な関係が必要である。しかし、一般的にこの両者の関係を正確に求めることは非常に難しい。例えば、一対一の単純な化学量論の場合でも、もうそれ以上リガンド濃度を高くしてもほとんどシグナルが変化しなくなるところまで実験できないと、変化量の最大値（このときタンパク質の結合サイトはリガンドで飽和している）を正確に推定することができない。以上の理由から、結合型リガンド濃度を測定する方法の特徴は、間接測定であること、どのような結合系にでも適用できる汎用性はないこと、である。

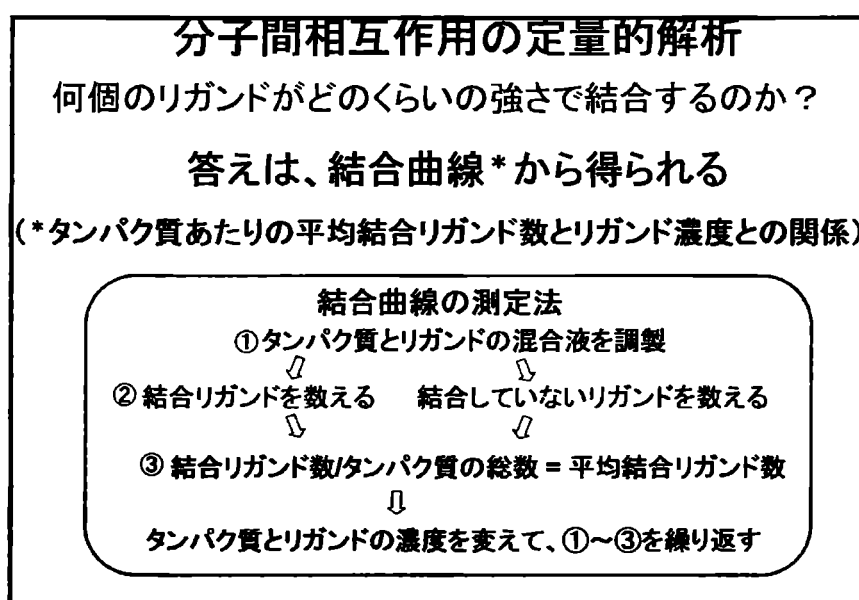


図 3

遊離型リガンド濃度を直接測定する方法として汎用されてきたのが、透析平衡と限外ろ過である。しかし、透析平衡でも限外ろ過でも、タンパク質やリガンド分子から見ると非常に表面積の広い膜を使用する。その結果、非特異的な膜への吸着や膜の内外の平衡への到達時間などコントロール困難な諸要素があり、様々な注意と操作の熟練が要求される。また、測定データの信頼性を保ちながら、微量測定を実現することや測定操作を自動化することも難しい。

そこで、本課題研究では、遊離型リガンド濃度を直接測定する有望な方法としてフロントアルゲルろ過法 (FGC) に着目した。FGC の原理は、分子ふるいとしての多孔性ゲルの発明後間もなく、1960 年代には、理論的にも実験的にも確立された。FGC では移動相と固定相との間に膜は存在しないので、結合平衡への到達が速く、また、ゲルマトリックスへの非特異的吸着の有無や程度を簡単に評価することができる。最大の欠点は、大量のサンプル必要なことだが（初期の FGC では約 10 mL が 1 データを測定するのに必要だった）、われわれは、すでに FGC に必要なサンプル量を 1～2 mL にまで減らすことに成功していた。しかし、FGC を血清タンパク質の高

精密結合機能測定に応用するためには、測定に必要なサンプル量をさらに一桁少なくする必要があった。本課題研究で、まず 100- $\mu\text{L}$  スケールの FGC の実現に取り組み、その結果、50–100  $\mu\text{L}$  の試料での FGC (mFGC) を確立することができた (詳細の論文は現在準備中)。

#### (5) フロントゲルろ過 (FGC) の測定原理

FGC では、多孔性ゲルで、その網目の中にリガンドは入り込めるがタンパク質は全く入り込めない孔のサイズのものを利用する。図 4 に、このような多孔性ゲルを充填したゲルろ過カラムを模式的に示す。

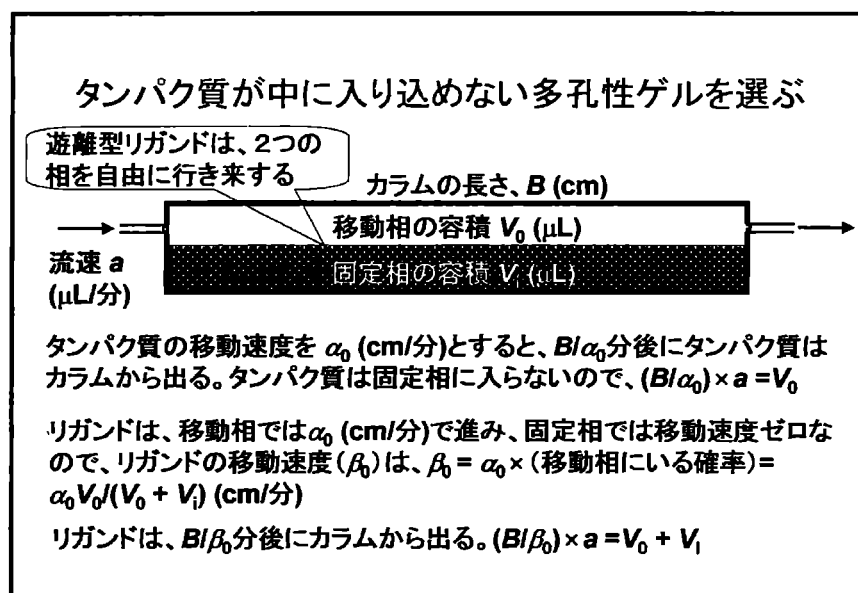


図 4

カラムの内部は、ゲル粒子の外 (移動相) とゲル粒子の内部 (孔の内部、固定相) とに分かれる。タンパク質やタンパク質に結合した状態のリガンドは、固定相に入ることはできない。タンパク質に結合していない遊離型のリガンドは、移動相と固定相の間を自由に速やかに行き来できる。

緩衝液やサンプルをカラムに流す流速を  $a$   $\mu\text{L}/\text{分}$  とする。いま、カラム中を入り口 (図 4 の左) から入って出口 (図 4 の右) に向かうタンパク質分子を考え、カラムの軸方向のその移動速度を  $\alpha_0$  cm/分 とする。カラムの長さを  $B$  cm とすると、タンパク質分子は、カラムに入ってから  $B/\alpha_0$  分後にカラム出口から出てくる。この間の溶出容積は、流速は  $a$   $\mu\text{L}/\text{分}$  なので、 $B/\alpha_0 \times a$   $\mu\text{L}$  である。タンパク質は常に移動相にいるので、移動相の容積 ( $V_0$ 、void volume という) は、このタンパク質分子の溶出容積と等しい。

$$V_0 = B/\alpha_0 \times a \text{ (}\mu\text{L)}$$

今度は、リガンドのみをカラムに流す場合を考える。リガンドは、移動相と固定相を行き来し、移動相に存在するときだけ、タンパク質と同様に、カラムの軸に沿って  $\alpha_0$  cm/分の速度で出口に向かって移動する。リガンドが移動相に滞在する確率は、 $V_0/(V_0 + V_1)$  なので、リガンドの移動速度 ( $\beta_0$ ) は、 $\beta_0 = \alpha_0 \times V_0/(V_0 + V_1)$  cm/分 である。カラムの長さは  $B$  cm なので、リガンドは、カラムに入ってから  $B/\beta_0$  分後に

カラム出口から出てくる。この間の溶出容積は、流速は  $a \mu\text{L}/\text{分}$  なので、

$$B/\beta_0 \times a = B(V_0 + V_i) \times a / (\alpha_0 \times V_0) = V_0 + V_i (\mu\text{L})$$

となり、リガンドの溶出容積は、移動相の容積と固定相の容積との和になる。

FGC では、カラムのゲルベッド容積と同程度の容積のサンプルをカラムに流す。まず、タンパク質とリガンドのそれぞれの単独溶液  $V_s \mu\text{L}$  ( $V_s \sim V_0 + V_i$ ) をカラムに流す場合を考える。予想されるクロマトグラムを図5に示す。

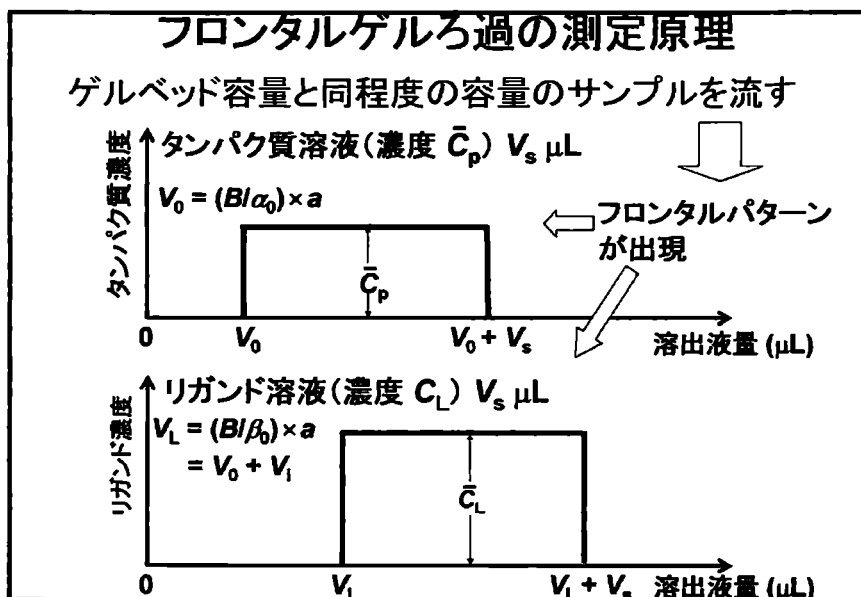


図5

最初に、濃度  $\bar{C}_p$  のタンパク質溶液  $V_s \mu\text{L}$  をカラムに流す場合を考える。タンパク質サンプルの前端は、サンプル注入開始後  $V_0 \mu\text{L}$  溶出したところでカラム出口に到達する。一方、タンパク質サンプルの後端は、サンプル注入開始後  $V_s \mu\text{L}$  溶出した時点でカラムに入り始めるので、 $V_0 + V_s \mu\text{L}$  溶出したところでカラム出口に到達する。従って、タンパク質サンプルは、その元の濃度  $\bar{C}_p$  のまま、溶出液量  $V_0 \mu\text{L}$  から  $V_0 + V_s \mu\text{L}$  の間で溶出する。その結果、図5の上図に示すような台形パターンのクロマトグラムが得られると予想される。

今度は、濃度  $\bar{C}_L$  のリガンド溶液  $V_s \mu\text{L}$  をカラムに流す場合を考える。リガンドサンプルの前端は、サンプル注入開始後  $V_L = V_0 + V_i \mu\text{L}$  溶出したところでカラム出口に到達する。一方、リガンドサンプルの後端は、サンプル注入開始後  $V_s \mu\text{L}$  溶出した時点でカラムに入り始めるので、 $V_L + V_s \mu\text{L}$  溶出したところでカラム出口に到達する。従って、リガンドサンプルは、その元の濃度  $\bar{C}_L$  のまま、溶出液量  $V_L \mu\text{L}$  から  $V_L + V_s \mu\text{L}$  の間で溶出する。その結果、図5の下図に示すような台形パターンのクロマトグラムが得られると予想される。

付録2で示すように、フロントルゲルろ過の溶出パターンは、上述の基本原則に基づいて厳密にシミュレーションすることができる。 $V_0 = 100 \mu\text{L}$ 、 $V_i = 60 \mu\text{L}$  のカラムに、濃度  $50 \mu\text{M}$  のタンパク質溶液  $100 \mu\text{L}$  を流す場合のシミュレーション結果を図6に示す。上の考察から予想された通り、溶出容積  $100 \mu\text{L}$  から始まり、溶出容積  $200$



μL で終わる台形型の溶出パターンが得られた。

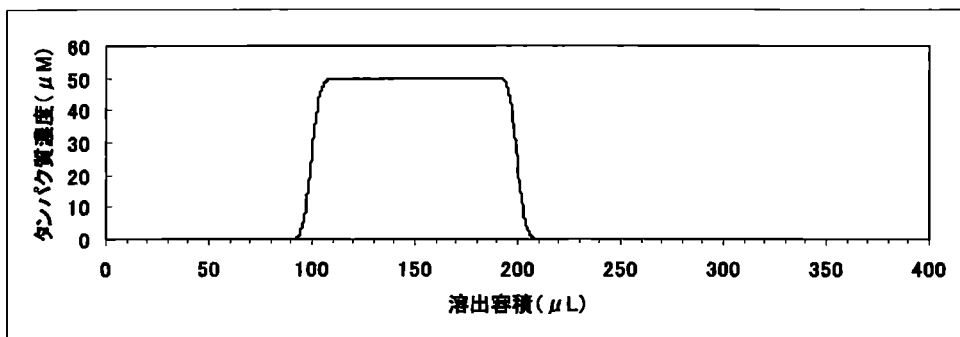


図 6

次に、同じカラムに濃度 5 μM のリガンド溶液 100 μL を流す場合のシミュレーション結果を図 7 に示す。この場合も、予想通り、溶出容積 160 μL から始まり、溶出容積 260 μL で終わる台形型のリガンドの溶出パターンが得られた。

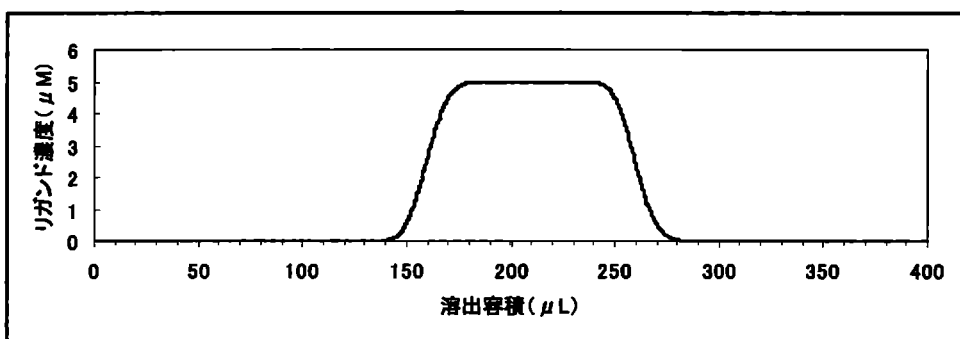


図 7

それでは、タンパク質-リガンド混合液（タンパク質の総濃度  $\bar{C}_p$ 、リガンドの総濃度  $\bar{C}_L$ ） $V_s$  μL をカラムに流すと、どのようなリガンドの溶出パターンが得られるだろうか？

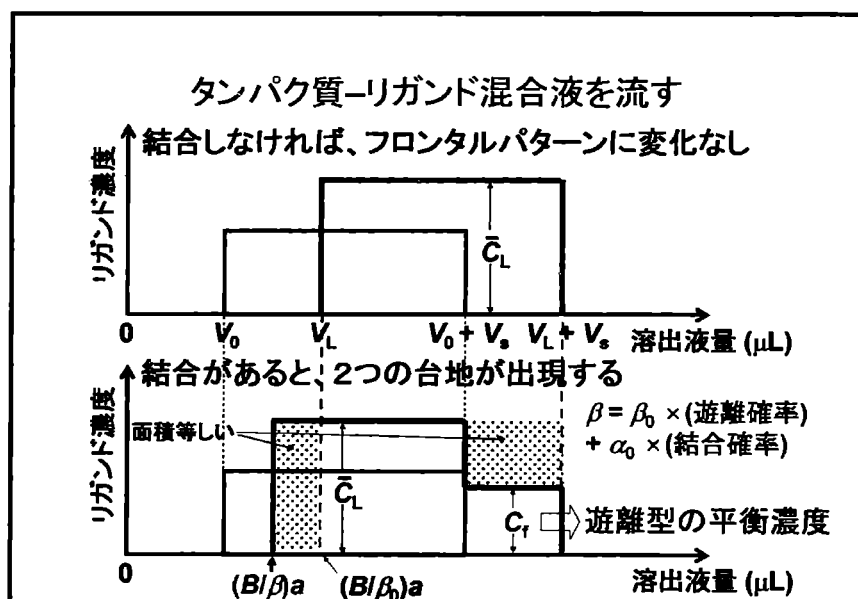


図 8

図8の上図に示すように、タンパク質とリガンドの間に相互作用がなければ、リガンドの溶出パターンは、単独でカラムに流した場合と変わらない。

しかし、両者の間に相互作用があると、移動相にタンパク質が共存するとき、リガンドは、タンパク質に結合した状態と結合していない遊離の状態との2つの状態を取るようになる。結合状態では、リガンドはタンパク質と同じ速度  $\alpha_0$  cm/分で移動し、遊離状態では  $\beta_0$  cm/分で移動する。従って、移動相にタンパク質が共存するときのリガンドの移動速度は、 $\beta = \beta_0 \times (\text{遊離状態の確率}) + \alpha_0 \times (\text{結合状態の確率})$  cm/分である。この移動速度 ( $\beta$ ) は、タンパク質の移動速度 ( $\alpha_0$ ) よりは遅く、遊離型のリガンドの移動速度 ( $\beta_0$ ) よりは速い。一方、リガンドを結合しているタンパク質も結合していないタンパク質も常に移動相にいたので、タンパク質の溶出は、リガンドがあってもなくても変わらない。従って、リガンドの先端は常にタンパク質と共存しており、移動速度  $\beta$  で進むので、図8の下図に示すように、溶出容積  $(B/\beta) \times a$  ( $\mu\text{L}$ ) でカラム出口に到達する。

タンパク質-リガンド混合液の後端がカラムに入ると、タンパク質分子は先に進むので、最後にカラムに入ったサンプル中のリガンドは、カラムに入ってからすぐに、移動相にタンパク質分子がない状態でカラムを移動することになる。その移動速度は  $\beta_0$  なので、リガンドの後端は、 $(B/\beta_0) \times a + V_s$  ( $\mu\text{L}$ ) =  $V_L + V_s$  ( $\mu\text{L}$ ) 溶出したところで、カラム出口に到達する。リガンドの先端の溶出からタンパク質の溶出が終了する  $V_0 + V_s$  ( $\mu\text{L}$ ) までの間は、リガンドは速度  $\beta$  で移動し、この間の溶出液のリガンド濃度は、元のサンプルのリガンド総濃度に等しい。タンパク質の溶出が終了した  $V_0 + V_s$  ( $\mu\text{L}$ ) からリガンドの溶出が終了する  $V_L + V_s$  ( $\mu\text{L}$ ) までの間は、リガンドは  $\beta_0$  で移動し、この間の溶出液のリガンド濃度は、サンプルの遊離型リガンドの平衡濃度に等しい (遊離型リガンドのみが固定相と移動相を自由に行き来できるため、固定相のリガンド濃度は、移動相の遊離型リガンド濃度と常に等しいことに注意)。

以上のことから、図8下図に示すように、リガンドの溶出には、移動速度の異なる2つの台形部分が出現し、先行する台形部分のリガンド濃度はサンプルのリガンド総濃度に等しく、2番目の台形部分のリガンド濃度が、サンプルの遊離型リガンド濃度そのものになる。

また、図8下図の網掛けで示した2つの領域の面積が等しいことに注意する。タンパク質との相互作用のために速く溶出したリガンドの量の分だけ、2番目の台形部分が元の高さから削られているのである。

タンパク質-リガンド混合液をカラムに流す場合の厳密なシミュレーションの結果を図9に示す。図6、7と同じ  $V_0 = 100 \mu\text{L}$ 、 $V_i = 60 \mu\text{L}$  のカラムに、タンパク質濃度  $50 \mu\text{M}$ 、リガンド濃度  $5 \mu\text{M}$  のサンプル  $100 \mu\text{L}$  を流す。結合サイト数は1で、解離定数は  $75 \mu\text{M}$  として計算した。予想通り、2つの台形部分が出現し、2番目の台形部分のリガンド濃度、 $3.0 \mu\text{M}$  は、サンプルの遊離型リガンドの平衡濃度と確かに一致する。

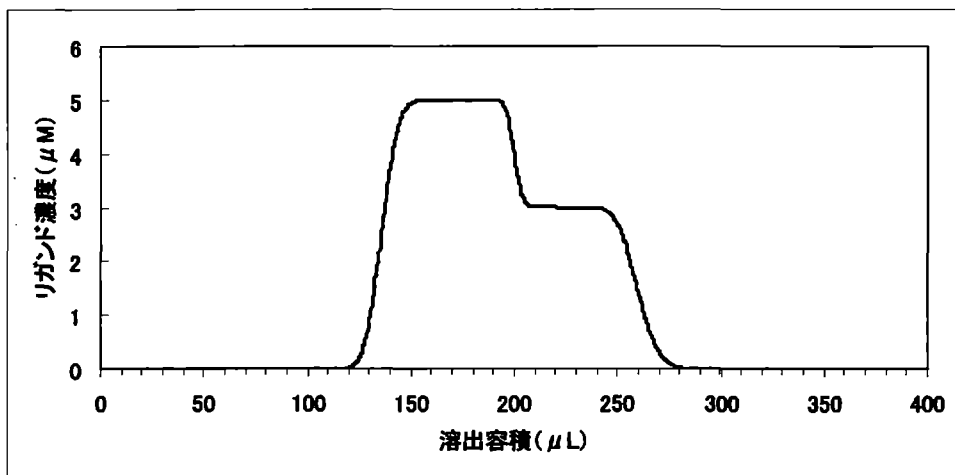


図 9

### (6) 微量フロンタルゲルろ過 (mFGC) の実験方法

本研究で HPLC システムを利用した mFGC の方法を考案した。図 10 にその概略を示した。なお、現在、自動で mFGC を行う専用装置を開発中である。

mFGC で一番重要なものは、ゲルろ過カラムである。ゲルろ過のカラムは、以下の諸点を考慮して最適なものを選択する。

- ① 理論段数が高い (微量化には鋭い溶出が不可欠)
- ② 排除限界分子量がタンパク質の分子量よりは小さく、リガンドの分子量よりは十分大きい (タンパク質はゲルの外のみ、リガンドはゲル内部にも十分浸透する)
- ③ タンパク質やリガンドとの吸着現象がない (リガンドとの可逆的な吸着は、ある程度までなら許容される)
- ④ ゲル粒子の力学的強度が強い

ここで、②の条件の「排除限界分子量がタンパク質の分子量より小さい」は、「タンパク質の溶出容積がリガンドを結合しても変化しない」に緩和することができる。この条件が満たされるかどうかは実験で容易に確認できる。

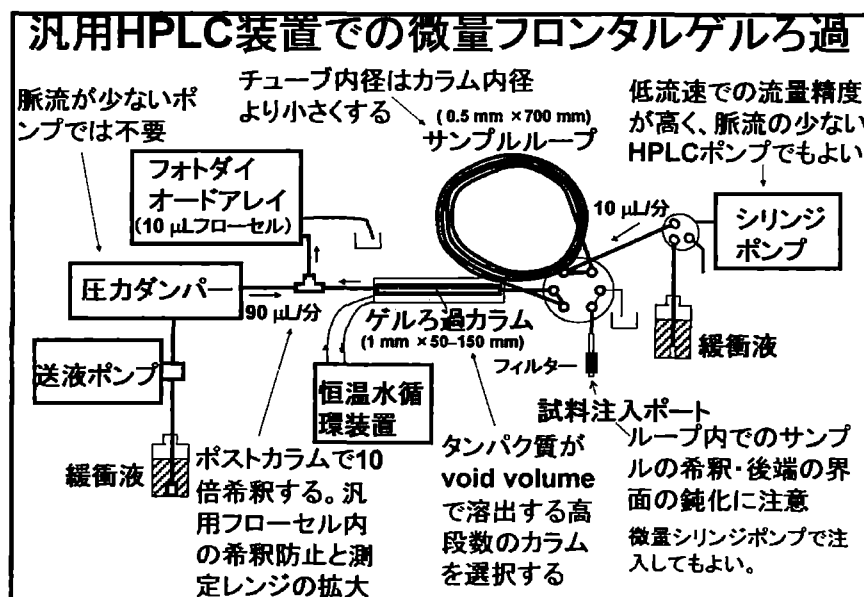


図 10

送液ポンプは、1-100  $\mu\text{L}$ /分の流速領域で、流量精度が高く、脈圧がゼロに近いものを使用する。図 10 に示すように、カラムの溶出液をポストカラムで純水または緩衝液で希釈（通常は 10 倍希釈する）してから、フローセル容積が 10  $\mu\text{L}$  程度の汎用検出器を使用する。この方法は、マイクロ専用のほとんどの検出器（フローセルの光路長を短くしているもの）と感度が変わらないだけでなく、検出器のダイナミックレンジを広げるメリットがある。

mFGC では試料液の前端と後端が緩衝液と鋭利な境界を保持したまま溶出することが決定的に重要である。そのためには、カラムの直前・直後の流路やサンプルループ内での試料の拡散を防ぐ工夫が必要である。本研究では、試料の後端の鋭利さを保持するために、試料によるサンプルループのオーバーフローとサンプルループ内の試料後端がカラム入り口に接近する前のサンプルループの切り離しを行っている。もうひとつの方法では、サンプルループを使用せず、ストローク容積が 200  $\mu\text{L}$  程度の高圧対応シリンジポンプで 3 方流路切り替えバルブを内蔵したものを使用する。シリンジポンプから直接試料をカラムに流すことで、試料液の前端と後端が拡散により崩れることを防ぐことができる。

#### (7) mFGC の実験による検証 1：酵素と拮抗阻害剤との相互作用

図 11 は、メタピロカテカーゼ (Mpc) とその拮抗阻害剤との mFGC で得られたクロマトグラムである。Mpc は、酸素分子を利用して、カテコール (= 1,2-ジヒドロキシベンゼン) の芳香環を開裂する 2 原子酸素添加酵素で、活性部位に 2 価鉄イオンがないと反応が進まない。Mpc の活性部位の鉄イオンは、自然に 3 価鉄イオンに酸化され失われやすい。従って、Mpc サンプルは、慎重に調製しても、活性部位に 2 価鉄イオンが結合しているものといないものとの混合物になる。 $\sigma$ -ニトロフェノール (ONP) は Mpc の拮抗阻害剤で、活性部位に 2 価鉄イオンが存在する場合に非常に強く本酵素に結合する。従って、Mpc-ONP 系は、本課題研究の主目的のひとつである嫌氣的 mFGC の開発に非常に有用な実験系のひとつである。

図 11 でのサンプルのカラムへの注入量は、わずかに 100  $\mu\text{L}$  である。Mpc 単独のクロマトグラムから、このカラムの実質移動相容積は約 35  $\mu\text{L}$  であることが分かる。一方、ONP 単独のクロマトグラムから、このカラムの移動相と固定相の総容積は約 65  $\mu\text{L}$  であり、カラムの固定相容積が、約 30  $\mu\text{L}$  となる。このように、FGC では、カラムの基本パラメータの評価やタンパク質やリガンドとゲル基材との吸着の有無や程度を簡単に調べることができる。

Mpc-ONP 混合液のクロマトグラムには、2つの台形領域が明瞭に認められた。ONP 溶出の前端部分の一部に先述のシミュレーションでは再現できない構造が認められるが（カラムの軸方向への濃度勾配による拡散の効果を無視していることが影響？）、それ以外の部分は、理論の予測通りのパターンを示している。2 番目の台形部分の ONP 濃度が、元の Mpc-ONP 混合液の遊離型 ONP の平衡濃度になる。この結果を用いて、Mpc 単量体当たりの ONP 平均結合数を計算することができる。

図 12 は、このような実験を繰り返すことで得られた Mpc の ONP 結合曲線である。

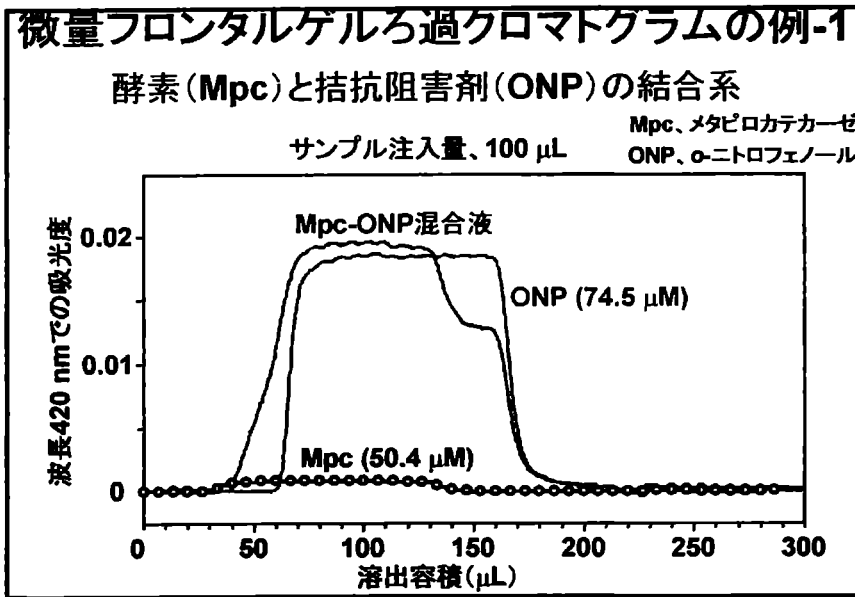


図 1 1

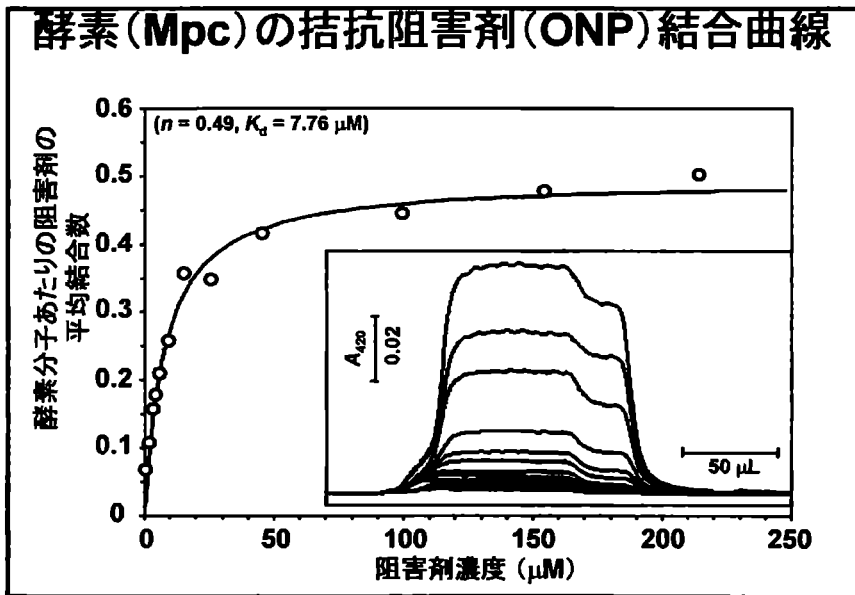


図 1 2

図 12 の挿入図に、全クロマトグラムを示した。この結合曲線から、結合部位数 0.49、解離定数  $7.76 \mu\text{M}$  が得られた (図の曲線は最適理論曲線)。1 より小さい結合部位数は、ONP が Mpc に強く結合するためには、活性部位に 2 価鉄イオンが必要なことを示唆する。この結論は、以下に示す分光滴定による解析からも支持された。

Mpc は無色だが、ONP は黄色をしている。従って、Mpc-ONP 相互作用は分光滴定でも調べることができ、FGC による解析結果を検証することができる。分光滴定の結果を図 13 に示す。Mpc 溶液 3.0 mL に ONP を少量ずつ加えていくと、550 nm-800 nm の波長領域に新しい吸収が出現した。最初は、加えた ONP の量に比例して吸収が増大したが、さらに加えていくと、やがて吸収の変化が小さくなり、もうそれ以上変化しなくなった。観測された吸光度の変化を、ONP の最終総濃度に

対してプロットしたものが、滴定曲線である。この解析から、結合サイト数が 0.48、解離定数が  $3.9 \mu\text{M}$  が得られた。mFGC による結果と比較すると、結合サイト数はよく一致したが、解離定数の値は約 2 倍の差があり、この差は実験誤差の範囲内とするには大きすぎる。現在、本科研費で購入した厳密な嫌気チャンパー内でこの結合系を mFGC と分光滴定の両方で調べ、嫌氣的 mFGC の実証研究を進めている。

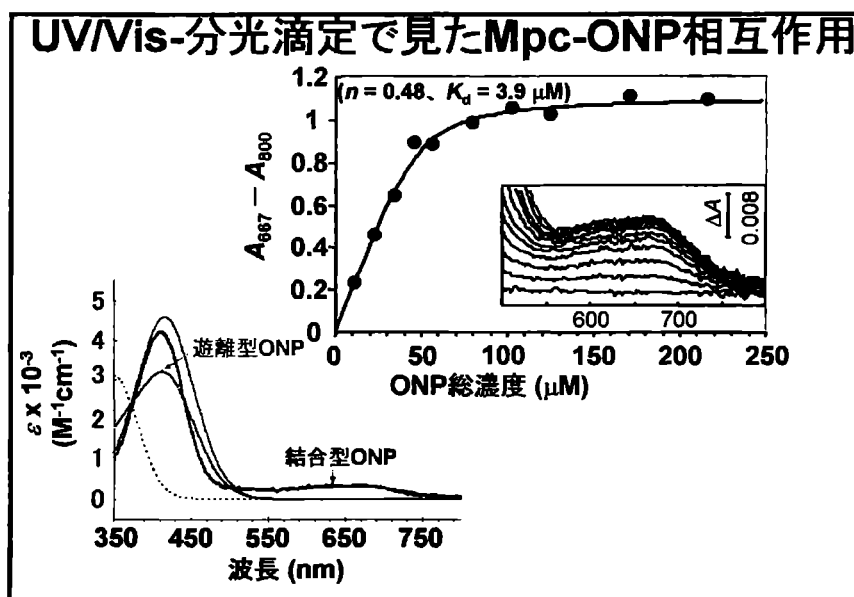


図 1 3

図の左下に示すように、結合型 ONP の吸収スペクトルには、 $500 \text{ nm} - 800 \text{ nm}$  に広がる新しい吸収が出現する。これは、活性部位の鉄イオンから ONP への電荷移動錯体の形成によるものである。また、結合型 ONP の吸収スペクトルは、点線で示す中性型の ONP の吸収スペクトルではなく、細い実線で示すアニオン型の ONP の吸収スペクトルによく似ており、アニオンの状態で結合していることを示唆する。

mFGC の信頼性や結合反応の化学量論と結合定数を直接測定することの意義を明らかにするには、この Mpc-ONP の例のように、滴定などの他の方法による研究が可能な結合系に mFGC による測定も同時に実施し、総合的にデータを解析することが役立つ。現在、われわれは、この観点から様々な結合系の解析を進めている。

さて、次に、タンパク質分子上にリガンド結合部位が複数存在するが結合系での mFGC の実証研究を行った。結合部位数が複数存在する系の解析には、FGC は不可欠な方法であることを強調したい。

#### (8) mFGC の実験による検証 2: 血清アルブミンとトリヨード安息香酸との相互作用

ヒト血清アルブミン (HSA) は、血清中に約  $0.5 \text{ mM}$  存在するタンパク質で、脂肪酸のような生理的物質をはじめ、様々な薬物を結合し、それらの体内での動態に強い影響を与えている。HSA は、血清中低分子キャリアタンパク質の代表的な存在であり、本課題研究で積極的に取り扱うタンパク質である。HSA とリガンドとの相互作用は様々な方法を用いて詳しく調べられおり、以下の表に示すように、様々なリガンドとの複合体の X-線結晶構造も解明されている。

結合リガンド	PDB code
Myristic acid (= tetradecanoic acid)	1BJ5, 1E7G
Myristic acid + tri-iodobenzoic acid	1BKE
Propofol (= 2,6-bis(1-methylethyl)phenol)	1E7A
Halothane (= 2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane)	1E7B
Myristic acid + halothane	1E7C
Decanoic acid (= capric acid)	1E7E
Dodecanoic acid (= lauric acid)	1E7F
Hexadecanoic acid (= palmitic acid)	1E7H
Octadecanoic acid (= stearic acid)	1E7I
Oleic acid (= <i>cis</i> -9-octadecanoic acid)	1GNI
Arachidonic acid (= <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoic acid)	1GNJ
Myristic acid + <i>R</i> -(+)-warfarin	1H9Z
<i>R</i> -(+)-warfarin	2BXD
Myristic acid + <i>S</i> -(+)-warfarin	1HA2
Tyroxine (= 3,3',5,5'-tetraiodo-L-thyronine)	1HK1
Myristic acid + tyroxine	1HK4
Heme	1N5U
Myristic acid + hemin	1O9X
Azapropazone	2BX8
Myristic acid + azapropazone	2BXI
3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF)	2BXA
Oxyphenbutazone	2BXB
Myristic acid + oxyphenbutazone	2BXO
Phenylbutazone	2BXC
Myristic acid + phenylbutazone	2BXP
Diflunisal	2BXE
Diazepam	2BXF
Ibuprofen	2BXG
Indoxyl sulfate	2BXH
Myristic acid + indomethacin	2BXM
Myristic acid + indomethacin + azapropazone	2BXK
Myristic acid + phenylbutazone + indomethacin	2BXQ
Myristic acid + 3,5-diiodosalicylic acid	2BXL
Myristic acid + iodipamide	2BXN
Myristic acid + aspirin	2I2Z
Myristic acid + salicylic acid	2I3O

これらの結晶構造は、結晶を得ることが可能であった実験条件での平均構造を示しており、実際の生理的溶液中での HSA の機能を分子レベルから理解するためには、

精密な結合曲線の測定が不可欠である。しかし、結晶構造の情報に見合うだけの客観性のある精密な結合データは極端に不足しており、本研究で、HSA の結合データベースの構築に着手した。

本研究では、まず、トリヨード安息香酸 (TIB) と HSA の相互作用に注目した。その理由は、脂肪酸を結合していない HSA と TIB の複合体の結晶構造では、TIB は HSA のサブドメイン IIA と IIIA とのマーカリガンドと結論された (He, X.M., and Carter, D.C. *Nature* (1992), 358, 209–215)。しかし、その後、脂肪酸 (ミリスチン酸) 結合型の HSA と TIB との複合体の結晶構造が決定され、TIB はサブドメイン IB と IIA に結合することが示された (Curry, S., et al. *Nature Struct. Biol.*(1998), 5, 827–835) (図 14 参照)。

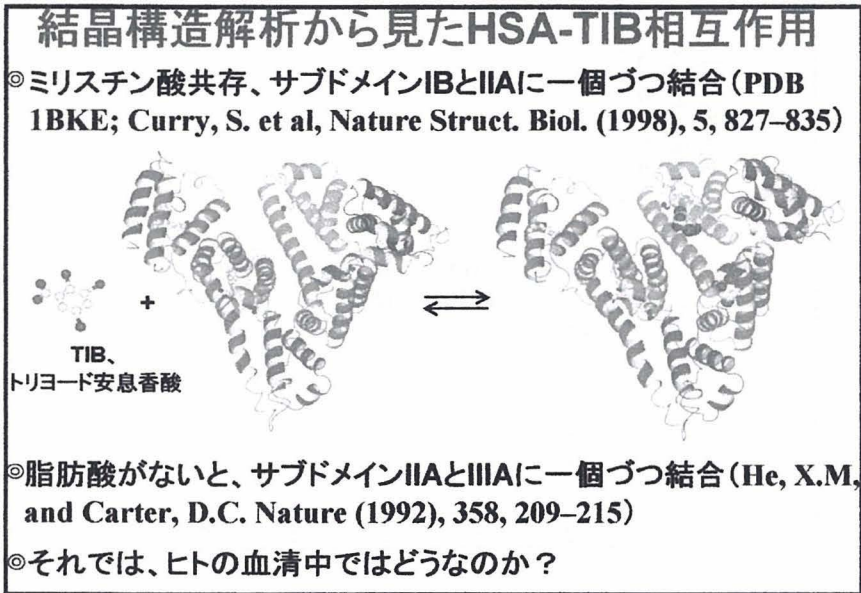


図 1 4

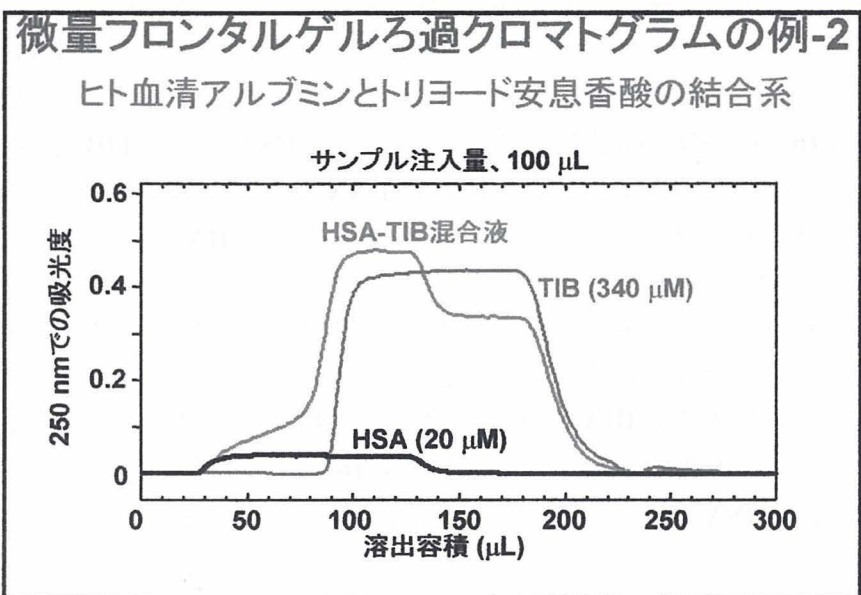


図 1 5

HSA-TIB の結合実験は報告がなく、この一見矛盾した結果を検討するために、溶



液中での結合実験を mFGC で行った。図 15 に典型的なクロマトグラムを示す。

HSA 単独のクロマトグラムから、このカラムの移動相容積は約 35  $\mu\text{L}$  であることが分かる。一方、TIB 単独のクロマトパターンから、TIB の溶出容積は約 95  $\mu\text{L}$  である。先例の ONP の 65  $\mu\text{L}$  と比べて約 30  $\mu\text{L}$  大きいのは、ゲル粒子と TIB の間に吸着現象が認められたためである。リガンドとゲル粒子との間に可逆的吸着がある場合は、固定相の見かけの容積が大きくなる。この例のように、適度の可逆的吸着は、mFGC の妨げにはならない。HSA-TIB 混合液のクロマトグラムは、2つの明瞭な台形部分を示した。脂肪酸を結合していない HSA とミリスチン酸を結合させた HSA のそれぞれについて、TIB 結合曲線を求めた。

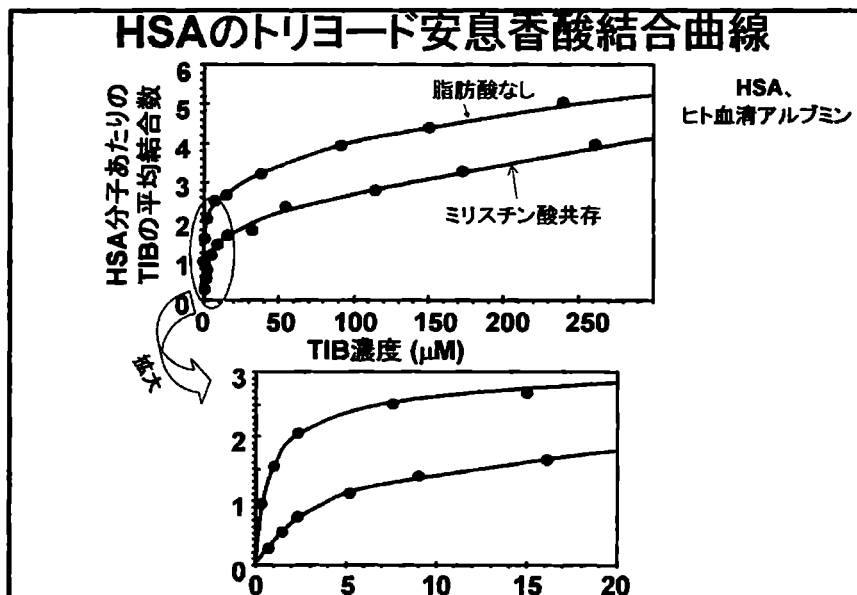


図 16

図 16 の上側の曲線が脂肪酸を結合していない HSA の TIB 結合曲線で、下側の結合曲線がミリスチン酸を結合した HSA の結果である。両者を比べると、TIB 結合部位のひとつがミリスチン酸の結合により強い影響を受け、そこには TIB が結合できなくなっていることが分かる。遊離型 TIB 濃度が 0-20  $\mu\text{M}$  の低濃度領域の拡大図を見ると (図 16 の下図)、脂肪酸を結合していない HSA には、TIB を強く結合する部位が 2つ認められるが、ミリスチン酸結合 HSA では、一つしか認められない。上述の結晶構造の結果と合わせて考えると、サブドメイン IIA とサブドメイン IIIA が TIB の主要結合部位と考えられる。ミリスチン酸結合 HSA の結晶構造と NMR による滴定実験の結果から、ミリスチン酸の最も強い結合部位がサブドメイン IIIA に存在することが明らかになっている。従って、ミリスチン酸結合型の HSA では、ミリスチン酸分子がサブドメイン IIIA に強く結合して占拠するため、この部位には TIB が結合できなくなると推測できる。もちろん、図 16 のデータだけではこの仮説の証明にはならないが、HSA-TIB の例は、定量的相互作用解析の重要性を示している。

#### (9) ラット個体別血清からのラットアルブミン (RSA) の精製

微量の血清からアルブミンを精製し、それをを用いてマーカーリガンドに対する結合曲線を測定することが、本課題研究の最終目標である。そのために、まず、ラッ

トの個体別に採取した血清 100  $\mu$ L から Cibacron Blue 固定化カラムとゲルろ過による RSA の迅速精製を検討した。図 17 は Cibacron Blue 固定化カラムから回収したアルブミン画分のゲルろ過によるクロマトグラムである。

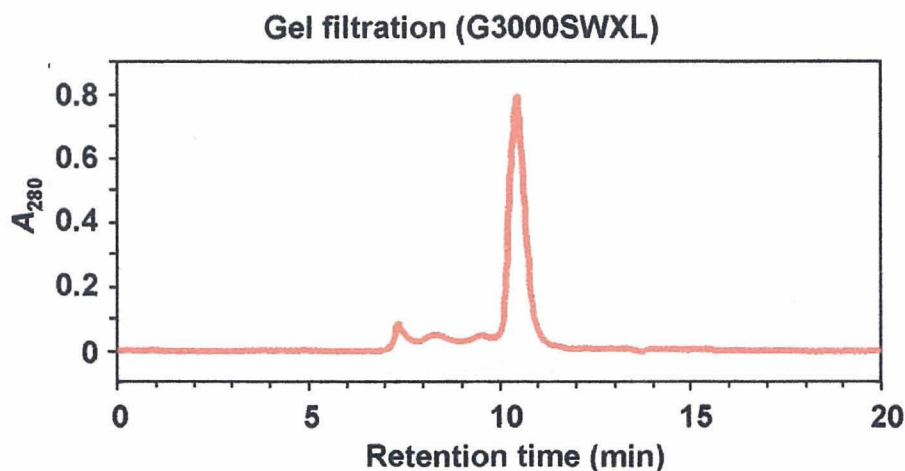


図 17

最後に溶出するピークがアルブミンで、このピークを分取し、その純度を SDS-PAGE で評価した(図 18)。約 90%の純度で RSA が精製できたが、収率は約 40%程度で、さらに高収率な精製法を検討中である。



図 18

#### (10) ラット個体別 RSA の S-ワーファリン結合曲線

ラット血清 100  $\mu$ L から部分精製した RSA を用いて ((9) を参照)、マーカリガンドのひとつである S-ワーファリン結合曲線を mFGC で測定した。その結果、図 19 に示すように、ワーファリンの主要結合部位がほぼ飽和するまでの範囲をほぼ満たす 8 つのデータポイントを得ることができた。この結果は、RSA の精製法を改善して収率を上げることができれば、非常に精密な結合曲線の測定が、100  $\mu$ L 程度の微量の血清で可能なことを証明するもので、血清タンパク質の高精密機能測定が臨床血液検査として技術的に可能であることを示している。

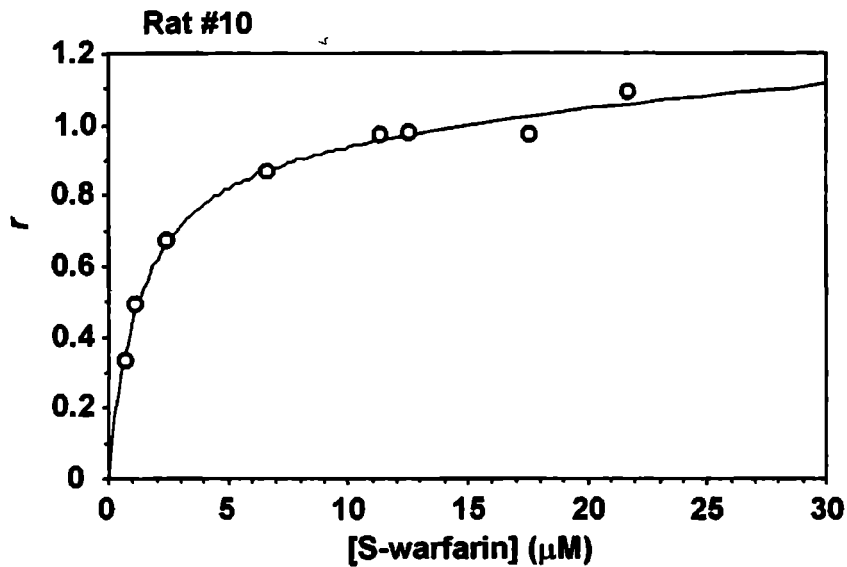


図 19

(11) 全自動 mFGC 専用装置

汎用 HPLC システムを工夫して利用することで、手動で mFGC を行うことは可能である。しかし、通常の HPLC 用のオートサンプラーを mFGC での試料注入に使用することはできない。その理由は、先述したように、試料と緩衝液との鋭利な境界面を保持するような試料導入にほとんどの HPLC 用のオートサンプラーが対応できない設計になっているためである。mFGC を実用的なものにするためには、結合曲線測定の実自動化が不可欠である。本課題研究の成果を基に、われわれが現在開発を目指している専用装置のコンセプトを図 20 に示す。

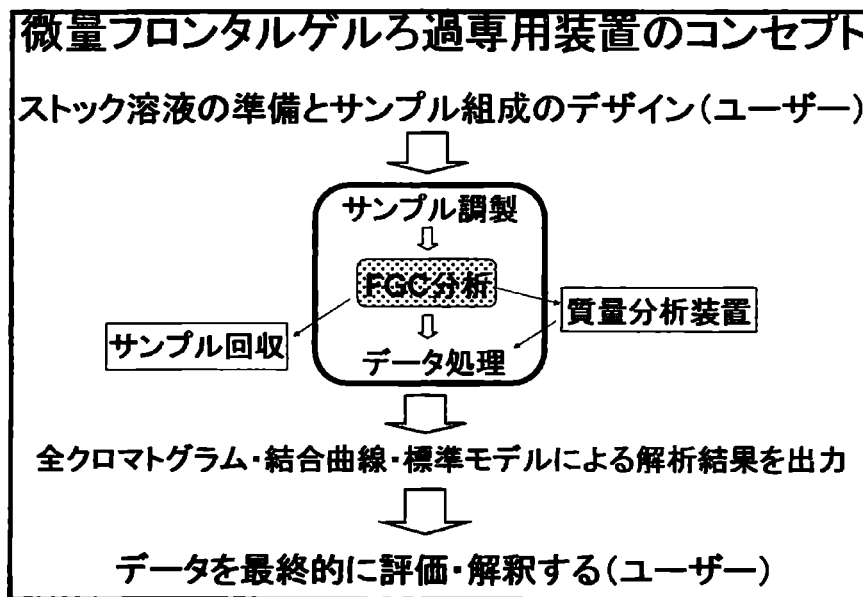


図 20

ユーザーは、タンパク質、リガンド、緩衝液などのストック溶液を調製し、mFGC で分析を行う試料の濃度条件を設計する。実際の試料の調製・mFGC 分析・結合曲

線の作成・結合曲線の初期解析は、すべて専用装置が行う。専用装置は、全クロマトグラム・結合曲線・標準モデルによる初期解析結果を出力する。ユーザーは、これらの結果と専門知識から、追加データの収集や再解析を行う。ユーザーは、単純作業の反復から完全に解放され、知的作業に専念できる。試料回収ユニットを装着すれば、貴重な試料を回収や、他の分析に供給することができる。ユニバーサルモニターとして、質量分析装置を定量モードで接続できれば、FGC専用装置の応用範囲がさらに広がる。

## (12) 微量フロンタルゲルろ過の今後の展望

### ① タンパク質-タンパク質相互作用の解析

リガンドがタンパク質の場合でも、リガンドタンパク質のみがゲル粒子内部に浸透するゲルろ過カラムを選択できれば、低分子リガンドと全く同様にして、FGCができる。リガンドタンパク質の分子量が1万程度の場合は、市販のカラムの中から、最適なカラムを容易に見つけられる。実際、補足資料-4で示すように、われわれはすでに mFGC でタンパク質-タンパク質相互作用の結合曲線の測定に成功している。しかし、mFGCの応用範囲を広げるためには、リガンドを結合する側のタンパク質の流体力学的なサイズを、その結合機能に大きな影響を与えない仕方で、大きくする技術が必要である。その方法として、PEGや糖鎖でタンパク質を修飾することやタンパク質同士を架橋することなどが考えられる。

### ② 嫌氣的 FGC

血清中のタンパク質を含め、多くのタンパク質が酸化還元状態に大きな影響を受けることが知られている。例えば、HSAが嫌氣的条件下でSH試薬に暴露されると、還元変性が起こる。酸素分子を基質とする酵素や、電子伝達系のように酸素分子が存在すると正常な反応が妨害される系の分子間相互作用は、酸素分子がない状態でしか調べられない。それだけでなく、補足資料-3と4で示すように、これらのタンパク質は酸化還元状態に依存してリガンド結合機能を変化させる。

低酸素状態から空気飽和の状態に試料を取り出すことで、試料内で酸素の活性化が起こり、タンパク質に予期しない人為的な酸化障害を引き起こす可能性がある。例えば、静脈血の酸素濃度は、空気飽和の状態よりかなり低い。静脈血中には様々な還元物質が含まれるので、採血後空気に触れる状態で血清を分離すると、血清タンパク質に生理的にはない障害を与え、それらの機能評価に重大な影響を与える可能性がある。

現在、mFGCシステムを本科研費で購入した嫌気チャンバーの中に設置し、これらの系への応用を検討している。

### ③ 薬物結合データベースの作成

先述の表で示したように、ヒト血清アルブミン (HSA) の結合サイトマーカーとして汎用されている薬物と HSA との複合体の結晶構造が解明されてきている。これまでも膨大な数の結合データが HSA に対して報告されているが、様々な測定方法と測定条件で得られたものの混在であるため、HSA の原子レベルでの構造に基

づいて機能を議論する時代に相応しいものとはいえない。そこで、われわれは、標準の測定条件を定め、統一した基準で主要薬物の結合データの再収集を mFGC で行い、データベース化する作業を開始した。タンパク質の構造からリガンド候補の構造を予測し、それらの結合定数を計算するプログラムが積極的に開発されているが、このデータベースは、これらのプログラムを検証するのにも役立つと思われる。

#### ④ 血清タンパク質機能検査

薬物の副作用を押さえその適用範囲を拡大するためには、個人レベルで薬物の体内動態を調べ、その人にとっての投与量の最適化が必要である。そのための第一歩として、微量の血液から嫌氣的に血清を分離し、HSA を精製する。精製 HSA とマーカー薬物との結合曲線を mFGC で測定する。HSA 機能の個体差、糖尿病などの病態による変化、加齢変化、性差などは、これまで系統的に調べられたことはない。mFGC を完全自動化すれば、HAS だけでなくその他の血清タンパク質についても、個人レベルでの機能評価が可能になる。

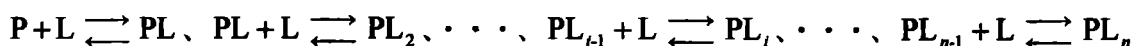
#### ⑤ 定量的相互作用スクリーニング

mFGC の主要な課題のひとつは、リガンドの汎用的な検出方法である。クロマトグラムの 2 つの台形部分を別々にトラップカラムに導入し、トラップされたリガンドを質量分析器で分別定量する方法が考えられる。先行する台形部分のマスペクトルと 2 番目の台形部分のマスペクトルの差スペクトルを取ると、複数のリガンドを一度に結合評価することも、原理的には可能である。定量 LCMS と mFGC とをつなぐインターフェイスの開発を目指したい。

### (13) FGC クロマトグラムの第二の台形部分のリガンド濃度が遊離型リガンドの平衡濃度に等しいことの証明

タンパク質-リガンド相互作用を含めた解離会合系のゲルろ過による解析について、謝名堂 昌信 (Masanobu Janado) 氏による優れた解説が、1976 年発行の蛋白質核酸 酵素 (Vol 21, 736-747) に掲載されている。ここでは、FGC で得られるクロマトグラムの 2 番目の台形部分のリガンド濃度が、遊離型リガンドの平衡濃度に等しいことを、謝名堂氏の解説も参考にしながら、より分かりやすく証明する。

タンパク質 P とリガンド L との間に、以下に示す結合反応が存在する場合について考える。



タンパク質にリガンドが結合する速度やタンパク質からリガンドが解離する速度は、各成分がカラムを移動する速度に比べて十分速いものとする。すなわち、カラム内のすべての場所で、局所的に結合平衡の状態にあると仮定する。カラムの軸に沿って移動する移動相の溶媒の流速 (線速度) を  $v_0$  で表す。カラムの単位長さ当たりの移動相の容積を  $\alpha$ 、固定相の容積を  $\beta$  とし、カラムの長さを  $B$  とする。ゲルろ過のカラムは、タンパク質 P がゲル粒子内部にまったく浸透できないものを選択してい

る。

まず、タンパク質を単独でカラムに流す場合を考える。タンパク質は、常に移動相にいたので、移動相の溶媒の移動速度と同じ速さでカラム軸に沿って進む。従って、タンパク質は、 $B/v_0$  時間後にカラムから溶出する。送液ポンプの流速を  $a$  とすると、この間に  $B/v_0 \times a$  の溶出がある。この溶出容積は、カラムの移動相の総容積 ( $V_0$ ) に等しい。

次に、リガンドを単独でカラムに流す場合を考える。リガンドはゲル粒子の内部に浸透するので、リガンドが移動相にいる確率は、移動相と固定相を合わせた総容積のうち移動相の占める割合になる。ゲル粒子の内部にいる間は、リガンドがカラムの出口へ向かう速度はゼロで、移動相にいる間は、リガンドは溶媒と同じ速度で移動する。その結果、リガンドの移動速度は、 $\left(\frac{\alpha}{\alpha+\beta}\right) \times v_0$  となる。リガンドは

$B/\left[\left(\frac{\alpha}{\alpha+\beta}\right) \times v_0\right]$  時間後に溶出するので、その溶出容積 ( $V_L$ ) は、

$$Ba/\left[\left(\frac{\alpha}{\alpha+\beta}\right) \times v_0\right] = V_0 \times \left(\frac{\alpha+\beta}{\alpha}\right) \text{である。}$$

さて、タンパク質の総濃度  $\bar{C}_p$ 、リガンドの総濃度  $\bar{C}_L$  の混合液を大容量 ( $V_S$ )、すなわち、 $V_0 + V_S$  が遊離型リガンドの溶出容積 ( $V_L$ ) よりも大きくなるように、カラムに流す場合を考える。タンパク質の溶出はリガンドの有無に影響を受けないので、溶出容積  $V_0$  で溶出が始まり、 $V_0 + V_S$  で溶出し終わる。この間の溶出液のタンパク質濃度は、 $\bar{C}_p$  である。

一方、リガンドの先端部は、常にタンパク質存在下で移動することになる。リガンドは、遊離型で移動相にいるときとタンパク質に結合しているときにのみ、溶媒と同じ速度で移動する。先端部分の単位長さ当たりの全リガンド数は、 $\bar{C}_L \times \alpha + C_L \times \beta$  である。移動相にいる遊離型リガンドの数は、 $C_L \times \alpha$  で、タンパク質に結合しているリガンド数は、 $(\bar{C}_L - C_L) \times \alpha$  である。リガンドの平均移動速度 ( $\bar{v}_L$ ) は、リガンドが移動相にいる確率を溶媒の移動速度にかけたものになる (式1)。

$$\bar{v}_L = \frac{[C_L \alpha + (\bar{C}_L - C_L) \alpha]}{(\bar{C}_L \alpha + C_L \beta)} v_0 \quad (1)$$

その結果、リガンドの先端部の溶出容積 ( $\bar{V}_L$ ) は、 $(B/\bar{v}_L) \times a$  となる。式1の両辺の逆数に  $Ba$  を掛けると、式2が得られる。

$$\bar{V}_L = \left[ \frac{\bar{C}_L + C_L (\beta/\alpha)}{C_L + (\bar{C}_L - C_L)} \right] V_0 \quad (2)$$

式2に、 $(\beta/\alpha)V_0 = V_L - V_0$  を代入して、 $C_L$  について解くと、次式が得られる。

$$C_L = \left( \frac{\bar{V}_L - V_0}{V_L - V_0} \right) \bar{C}_L \quad (3)$$

今度は、リガンドの後端について考える。混合液の最後の部分がカラムに入ると、リガンドはすぐにタンパク質に取り残されるので、タンパク質がない状態でカラムを移動することになる。その結果、リガンドの後端は、 $V_S + V_L$ で溶出する。

先行する台形部分は、 $\bar{V}_L$ で始まり、 $V_S + V_0$ で終了し、この間は試料液が元の組成のままで溶出する。その結果、先行する台形部分で溶出するリガンドの数は、 $(V_S + V_0 - \bar{V}_L) \times \bar{C}_L$ である。2番目の台形部分は、 $V_S + V_0$ から始まり（この溶出容積でタンパク質の溶出の終了する）、 $V_S + V_L$ で完了する。2番目の台形部分の溶出液のリガンド濃度を  $C_X$  とすると、この部分で溶出するリガンド数は、 $(V_L - V_0) \times C_X$  である。2つの台形部分で溶出するリガンドの総数は、カラムに流したサンプルのリガンドの総数に等しい（式4）。

$$\bar{C}_L \times V_S = (V_S + V_0 - \bar{V}_L) \times \bar{C}_L + (V_L - V_0) \times C_X \quad (4)$$

式4を  $C_X$  について解くと、

$$C_X = \left( \frac{\bar{V}_L - V_0}{V_L - V_0} \right) \bar{C}_L \quad (5)$$

式5の右辺は、遊離型リガンドの平衡濃度を与える式3の右辺と同じである。すなわち、フロンタルゲルろ過で得られる2番目の台形部分のリガンド濃度は、タンパク質とリガンドの混合液の遊離型リガンドの平衡濃度に等しい。

#### (14) FGC のシミュレーション

Microsoft Office Excel の Visual Basic Editor で作成したプログラムを以下に示す。データシートの5列目に溶出容積、6列目に溶出液のリガンド濃度、7列目に溶出液のタンパク質濃度、の各計算結果を出力する。1対1の結合で、リガンドの総濃度がタンパク質の総濃度より十分小さい場合について、厳密なシミュレーションである。

##### Sub FGCsimulatin2()

```

V0 = 100      'Void volume、移動相容積
ri = 1
Vi = ri * V0  '固定相容積、ri を変えることで V0 を基準にして変更できる
B = 10       'カラムの長さ
ra = V0 / B   '単位長さ当たりの移動相容積
rb = Vi / B   '単位長さ当たりの固定相容積
rsigma = 0.6 'リガンドが浸透できる固定相領域の容積と全固定相容積の比
rc = ra + rb * rsigma '単位長さ当たりのリガンドが分布する容積

```

$V_{max} = (V_0 + V_i) * 2$  '溶出液の総量が  $V_{max}$  になるまで計算する  
 $nv = 1000$   
 $dV = V_{max} / nv$  '  $dV$  だけ溶出するごとにカラムの各部位の濃度を計算する  
 $m = 200$  'カラムを  $m$  等分に分割し、各微小部分の濃度を計算する  
 $dx = B / m$  '  $ra * dx$  (各部分の移動相の容積) が  $dV$  より大きくなるようにすること  
 $rs = 1$   
 $V_s = rs * V_0$  'カラムに流すサンプル容積を  $V_0$  を基準にして決める  
 $ns = \text{Int}(V_s / dV)$   
 $C_0 = 5$  'サンプルのリガンドの総濃度  
 $V = 0$   
 $pt = 50$  'サンプルのタンパク質の総濃度  
 $kd = 10$  '解離定数

$\text{Cells}(1, 3) = pt * dV / (ra * dx)$   
 $q = C_0 * dV$   
 $\text{Cells}(1, 1) = q / (ra * dx + r\sigma * rb * dx / (1 + \text{Cells}(1, 3) / kd))$

For  $j = 2$  To  $m$   
 $\text{Cells}(j, 1) = 0$   
 $\text{Cells}(j, 3) = 0$   
 Next  $j$

$\text{Cells}(1, 5) = dV$   
 $\text{Cells}(1, 6) = \text{Cells}(m, 1)$   
 $\text{Cells}(1, 7) = \text{Cells}(m, 3)$

For  $j = 1$  To  $m$   
 $\text{Cells}(j, 2) = \text{Cells}(j, 1)$   
 $\text{Cells}(j, 4) = \text{Cells}(j, 3)$   
 Next  $j$

\* For  $i = 2$  To  $ns$   
 $\text{Cells}(1, 3) = \text{Cells}(1, 4) + (pt - \text{Cells}(1, 3)) * dV / (ra * dx)$   
 $q = \text{Cells}(1, 2) * ra * dx + \text{Cells}(1, 2) * rb * r\sigma * dx / (1 + \text{Cells}(1, 4) / kd) + C_0 * dV$   
 $\quad - \text{Cells}(1, 2) * dV$   
 $\text{Cells}(1, 1) = q / (ra * dx + rb * r\sigma * dx / (1 + \text{Cells}(1, 3) / kd))$

For  $j = 2$  To  $m$   
 $\text{Cells}(j, 3) = \text{Cells}(j, 4) + (\text{Cells}(j - 1, 4) - \text{Cells}(j, 4)) * dV / (ra * dx)$   
 $q = \text{Cells}(j, 2) * ra * dx + \text{Cells}(j, 2) * rb * r\sigma * dx / (1 + \text{Cells}(j, 4) / kd) +$



$(\text{Cells}(j - 1, 2) - \text{Cells}(j, 2)) * dV$   
 $\text{Cells}(j, 1) = q / (r_a * dx + r_b * r_{\text{sigma}} * dx / (1 + \text{Cells}(j, 3) / kd))$   
 Next j

$\text{Cells}(i, 5) = i * dV$   
 $\text{Cells}(i, 6) = \text{Cells}(m, 1)$   
 $\text{Cells}(i, 7) = \text{Cells}(m, 3)$

For j = 1 To m  
 $\text{Cells}(j, 2) = \text{Cells}(j, 1)$   
 $\text{Cells}(j, 4) = \text{Cells}(j, 3)$

Next j  
 Next i

For i = ns + 1 To nv  
 $\text{Cells}(1, 3) = \text{Cells}(1, 4) - \text{Cells}(1, 3) * dV / (r_a * dx)$   
 $q = \text{Cells}(1, 2) * r_a * dx + \text{Cells}(1, 2) * r_b * r_{\text{sigma}} * dx / (1 + \text{Cells}(1, 4) / kd) - \text{Cells}(1, 2) * dV$   
 $\text{Cells}(1, 1) = q / (r_a * dx + r_b * r_{\text{sigma}} * dx / (1 + \text{Cells}(1, 3) / kd))$

For j = 2 To m  
 $\text{Cells}(j, 3) = \text{Cells}(j, 4) + (\text{Cells}(j - 1, 4) - \text{Cells}(j, 4)) * dV / (r_a * dx)$   
 $q = \text{Cells}(j, 2) * r_a * dx + \text{Cells}(j, 2) * r_b * r_{\text{sigma}} * dx / (1 + \text{Cells}(j, 4) / kd) + (\text{Cells}(j - 1, 2) - \text{Cells}(j, 2)) * dV$   
 $\text{Cells}(j, 1) = q / (r_a * dx + r_b * r_{\text{sigma}} * dx / (1 + \text{Cells}(j, 3) / kd))$   
 Next j

$\text{Cells}(i, 5) = i * dV$   
 $\text{Cells}(i, 6) = \text{Cells}(m, 1)$   
 $\text{Cells}(i, 7) = \text{Cells}(m, 3)$

For j = 1 To m  
 $\text{Cells}(j, 2) = \text{Cells}(j, 1)$   
 $\text{Cells}(j, 4) = \text{Cells}(j, 3)$

Next j  
 Next i

End Sub

(15) 謝辞

本研究の主要部分は、文部科学研究費補助金の支援により実施できました。補助金の交付に深く感謝いたします。

滋賀医科大学医学部 生化学・分子生物学講座の堀池喜八郎 教授に、本研究に対する良き理解と適切な指導・助言を感謝いたします。同講座（分子生理化学部門）の田中裕之、山本篤の両氏に、本研究への協力を感謝いたします。大阪大学 大学院生命機能研究科の東城博雅 准教授に、FGC 専用装置の開発に対する協力と指導を感謝いたします。産業技術総合研究所 生物情報解析センターの千田俊哉、千田美紀の両博士に、タンパク質-タンパク質相互作用への FGC の応用と嫌氣的 FGC の試行の機会を与えていただいたことを感謝いたします。